

L2 ANSWER 18 OF 22 CA COPYRIGHT 2007 ACS on STN

Full Text	Citing References
--------------	----------------------

AN 131:72952 CA  
 ED Entered STN: 31 Jul 1999  
 TI The tofu whose **aglycone** ratio of the isoflavone is high.  
 IN Kudo, Shigeo  
 PA Taishi Foods Co., Ltd., Japan  
 SO Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 5 pp.  
 CODEN: JKXXAF  
 DT Patent  
 LA Japanese  
 IC ICM A23L001-20  
 ICS A23L001-20  
 CC 17-10 (Food and Feed Chemistry)  
 FAN.CNT 1

	PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
PI	JP 11169127	A	19990629	JP 1997-362536	19971215
PRAI	JP 1997-362536		19971215		

## CLASS

PATENT NO.	CLASS	PATENT FAMILY CLASSIFICATION CODES
JP 11169127	ICM	A23L001-20
	ICS	A23L001-20
	IPCI	A23L0001-20 [ICM,6]; A23L0001-20 [ICS,6]
	IPCR	A23L0001-20 [I,A]; A23L0001-20 [I,C*]

AB The isoflavonoid aglycon in **soybean** useful for manufg. tofu is increased by incubation and/or grinding of the **soybean** at elevated temp. (25-65?) to promote the activity of ?-**glucosidase** (I). The ground **soybean** is kept in the elevated temp. for prolonged time such as 30 mins to 3 hs to enhance the enzymic action. Optionally I is added to the **soybean** milk. The isoflavonoid aglycon amts. to e"10 wt.% of the total isoflavone.

ST tofu isoflavonoid aglycon high **glucosidase**

IT Health food

**Soybean** (Glycine max)

**Soybean** curd

(tofu whose aglycon ratio of isoflavone is high)

IT Isoflavonoids

RL: BOC (Biological occurrence); BPN (Biosynthetic preparation); BSU (Biological study, unclassified); BIOL (Biological study); OCCU (Occurrence); PREP (Preparation)

(tofu whose aglycon ratio of isoflavone is high)

IT 574-12-9, Isoflavone

RL: BOC (Biological occurrence); BPR (Biological process); BSU (Biological study, unclassified); BIOL (Biological study); OCCU (Occurrence); PROC (Process)

(tofu whose aglycon ratio of isoflavone is high)

IT 9001-22-3, ?-**Glucosidase**

RL: CAT (Catalyst use); USES (Uses)

(tofu whose aglycon ratio of isoflavone is high)

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-169127

(43)公開日 平成11年(1999) 6月29日

(51)Int.Cl.<sup>8</sup>  
A 2 3 L 1/20

識別記号  
1 0 4

F I  
A 2 3 L 1/20

1 0 4 Z  
Z  
E

審査請求 未請求 請求項の数12 F D (全 5 頁)

(21)出願番号 特願平9-362536

(22)出願日 平成9年(1997)12月15日

(71)出願人 591009004

太子食品工業株式会社

青森県三戸郡三戸町大字川守田字沖中68番  
地

(72)発明者 工藤 茂雄

青森県三戸郡三戸町大字川守田字沖中68番  
地

(74)代理人 弁理士 佐藤 文男 (外1名)

(54)【発明の名称】 イソフラボンのアグリコン比率が高い豆腐

(57)【要約】

【課題】 大豆加工食品中の疾患等の発生を防ぐ機能を有するイソフラボンの生体利用性を改善するため、アグリコンの比率を高めることにより、生理機能性を高めた豆腐を提供する。

【解決手段】 豆腐中のイソフラボンのアグリコン比率を高めるため、大豆の浸漬温度および磨砕温度を高め、設定すること、磨砕後の放置時間を長く、温度を高く維持することによってβ-グルコシダーゼの活性を促してアグリコンの遊離を積極的に生じさせる。さらには、豆乳にβ-グルコシダーゼ活性を持つ精製酵素を添加し、保温することによってアグリコンの割合を50%以上にまで高めることができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 豆腐中の総イソフラボン重量に占めるアグリコンの重量比が10%以上であることを特徴とする豆腐

【請求項2】 豆腐の製造工程において、大豆の浸漬温度を25℃～65℃とすることを特徴とする請求項1の豆腐

【請求項3】 豆腐の製造工程において、大豆磨砕後、25℃～65℃に保持したまま、30分～3時間放置することを特徴とする請求項1あるいは請求項2の豆腐

【請求項4】 常法によって製造した豆乳にβ-グルコシダーゼ活性を持つ酵素を0.1～0.5 U/ml添加し、10℃～65℃で30分～2時間保温することを特徴とする請求項1の豆腐

【請求項5】 豆腐中の総イソフラボン重量に占めるアグリコンの重量比が20%以上であることを特徴とする豆腐

【請求項6】 常法によって製造した豆乳にβ-グルコシダーゼ活性酵素を0.5～2 U/ml添加し、10℃～65℃で30分～2時間保温することを特徴とする請求項5の豆腐

【請求項7】 大豆磨砕時の水温を25～65℃とし、磨砕後その温度のまま3～5時間保温することを特徴とする請求項5の豆腐

【請求項8】 大豆の浸漬温度を25℃～65℃、磨砕時の水温を25～65℃にし、磨砕後の保温時間を0.5～3時間とすることを特徴とする請求項5の豆腐

【請求項9】 磨砕時の水温を25～65℃にし、磨砕後0.5～2時間保温した後、豆乳にβ-グルコシダーゼ活性酵素を0.1～0.5 U/ml添加し、10～65℃で0.5～1時間保持することを特徴とする請求項5の豆腐

【請求項10】 豆腐中の総イソフラボン重量に占めるアグリコンの重量比が50%以上であることを特徴とする豆腐

【請求項11】 常法によって製造した豆乳に精製β-グルコシダーゼを2 U/ml以上添加し、10～65℃で2時間以上保持することを特徴とする請求項10の豆腐

【請求項12】 大豆磨砕時の水温を25～65℃にし、磨砕後2時間以上保温した後に豆乳に精製β-グルコシダーゼを0.5 U/ml添加し、10～65℃で1時間以上保持することを特徴とする請求項10の豆腐

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は大豆中に含まれるイソフラボンの生体利用性および機能性を向上させた豆腐に関する。

## 【0002】

【従来の技術】豆腐はわが国における代表的な大豆加工食品である。しかし、大豆中に含まれるイソフラボンや

サボニンといった配糖体成分は、苦み、えぐ味、刺激味などの収斂味をもつ。さらにイソフラボンのアグリコンは、糖の付いているグリコシドより強い収斂味をもつ。従来の豆腐の製造法の1例をあげれば以下のようである。大豆100gに蒸留水を350ml加え、10℃で18時間浸漬した。水をきった後15℃の蒸留水を加水しながら磨砕して5倍加水の呉を得た。次に5倍希釈のシリコン(KM72F, ShinEtsu)を10ml添加して、加熱しながら蒸気を注入して98℃まで昇温後、1分30秒間保温した。加熱した呉は、約70g/cm<sup>2</sup>で加圧して豆乳を分離した。豆乳には0.3%の凝固剤を添加して、85℃で45分間凝固させて絹ごし豆腐を製造する。このような、経験的、科学的に開発され利用されてきた豆腐の製造工程は、結果的に見ると、できるだけ豆乳へのイソフラボンの移行が少ない方法や、豆乳中のアグリコンが増化しないような方法となっているのは、この収斂味による豆腐の風味の低下を避けるためであったと見ることが出来る。

【0003】イソフラボンのアグリコンが増加する条件としては、大豆中に含まれるβ-グルコシダーゼが適度の水分と温度を与えられることにより活性化した場合である。したがって従来の製法においては、低温浸漬、冷水磨砕、磨砕直後の加熱といったβ-グルコシダーゼが作用しないような条件を組み合わせる方法が一般的であった。この結果、従来法によって製造された豆腐中のイソフラボンのアグリコン重量比は5%以下であった。

【0004】近年、大豆中に多く含まれるイソフラボンには、D. E. Prattらによる抗酸化作用〔J. Food Sci., 44, 1720(1979)〕、M. G. Hertogらによる抗心疾患作用〔Lancet, 342, 1007(1993)〕、M. L. Brandiらによる骨代謝改善作用〔Bone Miner., 19, S3(1992)〕、T. Akiyamaらによるガン細胞由来のチロシンキナーゼ阻害作用〔J. Biol. Chem., 262, 5592(1987)〕など、多くの生理機能のあることが報告されている。これらの効果は in vitro, in vivoの両面から検討されてはいるものの、イソフラボンの消化吸収についてR. A. Kingら〔J. Nutr., 126, 176(1996)〕やX. Xuら〔J. Nutr., 125, 2307(1995)〕の報告によれば、摂取されたイソフラボンはアグリコンの形になってから吸収されるとされている。

【0005】アグリコンの遊離は、胃での加水分解酵素の作用と腸管内での腸内微生物由来β-グルコシダーゼの作用によって起こる。R. A. Kingらの報告によれば、ラットでグリコシドとアグリコンの吸収試験を行った結果、血中のイソフラボン濃度上昇はグリコシドに比較してアグリコンの方が早かったとしている。このことから、胃での加水分解により分解されなかったグリコシドは腸内微生物由来β-グルコシダーゼの作用によってアグリコンを遊離した後に吸収されることを示唆している。

【0006】腸内微生物の中でβ-グルコシダーゼ活性

を持つものは *Lactobacilli*、*Bacteroides*、*Bifidobacteria* 等である。またイソフラボンの基本骨格自体を分解してしまう酵素をもつ腸内微生物の存在も明らかになっている。X. Xu らの報告によれば、ヒトにイソフラボンを含む食品を与えた結果、糞中へのイソフラボンの排泄量が低いグループと排泄量が高いグループに別れたが、糞への排泄量が高い方が血中のイソフラボン濃度が高くなり、尿への排泄も高くなるという利用性の矛盾を生じた。したがって、個人の持つ微生物相が  $\beta$ -グルコシダーゼ活性に乏しく、イソフラボンを分解するような酵素を持つ微生物が多い場合、イソフラボンの生体利用性は低くなることが示唆されている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】こうして吸収されるアグリコンについて、種々の生理機能が *in vitro* の実験で報告されていることから、イソフラボンの生体利用性を高めた大豆加工食品の提供、すなわちアグリコンの比率の高い食品の提供は、イソフラボンの生体利用性の低い個人に対してもイソフラボンの摂取量を高めることができるものと考えられる。さらに、日本人のイソフラボン摂取量の50%以上は豆腐由来であることから、アグリコンの比率の高い豆腐の提供は、豆腐からのイソフラボンの生体利用性を大幅に改善し生理機能を高めるものと考えられる。大豆製品の摂取量が減少してきている今日、イソフラボンによって抑制されていた疾患等の発生を防ぐためにも、生体利用性の高い大豆製品からのイソフラボン摂取が望まれるが、従来の豆腐製造工程では、前記のようにイソフラボンのアグリコン重量比は5%程度であり、生体利用性や生理機能性はそれほど高いとは考えられず、その改善が望ましい。

【0008】

【課題を解決するための手段】この発明の豆腐は、総イソフラボン重量に占めるアグリコンの割合が10%以上であることを特徴とする。この総イソフラボン重量に占めるアグリコンの割合は、望ましくは20%以上、さらには50%以上であることが望ましい。イソフラボンの利用率のよい人と悪い人とは、吸収率には3倍もの相違がある。従来の豆腐の総イソフラボン重量に占めるアグリコンの割合は2~4%であり、これを10%程度にすることによって利用率の悪い人の吸収量を利用率のよい人が従来の豆腐を接種したときと同じ程度まで高めることが出来る。また、イソフラボンは女性ホルモン様作用を示す。一般的な女性は閉経後、尿中に排泄されるイソフラボン量が1/5程度になる。つまり閉経後はイソフラボンが女性ホルモンの代役をしていると考えられる。20%アグリコンの豆腐は通常の豆腐の5倍以上のアグリコンを含むことから、女性ホルモンとしての利用分を補うことができるものと期待される。さらに、Akiyamaらのガン細胞由来チロシナーゼ阻害作用の試験と、R.A.Kingらの試験結果から推察すると、摂取したイ

ソフラボンが明らかに機能を発揮するような生体内濃度になるためには、1丁400gの豆腐に換算して10丁程度を摂取しなければならず、現実として摂取できない。しかし、イソフラボンのアグリコンが通常の豆腐の10倍以上である総イソフラボン重量に占めるアグリコンの割合が50%の豆腐を提供できれば、現実的な摂取量でこの要求を満たすことができる可能性が開ける。

【0009】このような豆腐は、乾燥大豆の浸漬温度および磨砕温度を高めに設定すること、磨砕後の放置時間を長く、酵素の作用範囲で温度を高く維持することによって  $\beta$ -グルコシダーゼの活性を促し、その作用によってアグリコンの遊離を積極的に生じさせることによって製造することができる。さらには、豆乳に  $\beta$ -グルコシダーゼ活性を持つような酵素を添加し、保温することによってアグリコンの割合を20%以上にまで高めることができる。そして、精製  $\beta$ -グルコシダーゼを用いることによって、50%以上の豆腐を製造することができる。

【0010】

20 【発明の実施の形態】上記豆腐中の総イソフラボン重量に占めるアグリコンの割合を10%以上とすることは、以下のような方法によって達成できる。

①乾燥大豆の浸漬温度を25℃~65℃と従来に比して高温とする。

②大豆磨砕後の放置時間を30分~3時間と長くし、加水温度を調節した上で放置温度を25℃~65℃と高温とする。

30 ③常法によって製造した豆乳に  $\beta$ -グルコシダーゼ活性を持つような酵素を0.1~0.5U/ml添加し、10℃~65℃で30分~2時間保温する。

【0011】さらに、アグリコンの総イソフラボン重量に占める割合を20%以上にする場合には、

①アーモンド製の  $\beta$ -D-グルコシダーゼ、セルラーゼA「アマノ」(商標)、セルラーゼYNCあるいはアスペルギルス属から粗精製した  $\beta$ -D-グルコシダーゼのような  $\beta$ -グルコシダーゼ活性が比較的高い酵素を0.5~2U/ml添加し、10℃~65℃で30分~2時間保温する。

40 ②大豆磨砕時の水温を25~65℃にし、磨砕後の保温時間を3~5時間とする。

③大豆の浸漬温度を25℃~65℃、磨砕時の水温を25~65℃にし、磨砕後の保温時間を0.5~3時間とする。

④磨砕時の水温を25~65℃にし、磨砕後0.5~2時間保温した後、豆乳に  $\beta$ -グルコシダーゼ活性が比較的高い酵素を0.1~0.5U/ml添加し、10~65℃で0.5~1時間保持する。

などの方法によって製作できる。

50 【0012】アグリコンの総イソフラボン重量に占める割合を50%以上とすることは特に好ましい。このよう

な豆腐を製造するためには、

①比較的高度に精製した $\beta$ -グルコシダーゼを2U/ml以上添加し、10～65℃で2時間以上保持することが必要となる。

②あるいは大豆磨砕時の水温を25～65℃にし磨砕後2時間以上保温した後に豆乳に精製 $\beta$ -グルコシダーゼを0.5U/ml添加し、10～65℃で1時間以上保持する。

ことによって製造可能である。

【0013】

【実施例】以下、実施例によって本発明をさらに詳細に説明する。

#### 1. 豆腐の製造方法

上述の豆腐製造方法の常法のうち、浸漬時、磨砕時における温度、磨砕後における温度と保温時間を変化させ、その影響を検討した。

#### 2. イソフラボンの分析方法

豆腐には0.1%酢酸-エタノール溶液と0.1%酢酸-70%エタノール溶液を添加してイソフラボンの抽出を行った。イソフラボンの分析はWatersのHPLC, LC Module 1を用い、YMC製の逆相カラム、YMC-Pack ODS-AM AM-303(φ4.6×250mm)S-5 $\mu$ m, 120Aを使用した。溶出は0.1%酢酸水溶液と0.1%酢酸-アセトニトリル溶液を使用し、260nmで検出した。それぞれのイソフラボン類の含量は、スタンダードの面積から算出した。

【0014】浸漬時におけるアグリコンの増加

大豆浸漬時の水温を15～65℃としてアグリコンの遊離を検討した。この時の浸漬時間は18時間にした。アグリコンの総イソフラボン重量に占める割合が10%以上になったのは、浸漬温度が25℃以上のものであったが、この条件範囲ではアグリコンの総イソフラボン重量に占める割合が20%以上のものは製造できなかった。

【0015】磨砕によるアグリコンの増加

呉を得た後の放置時間と放置温度について検討した。大豆磨砕時の水温は放置温度と同じにした。放置時間は0～5時間、放置温度を15～65℃としてアグリコンの遊離を検討した。この時、アグリコンの総イソフラボン重量に占める割合が10%以上になる条件は65℃の場合には30分以上放置、45℃の場合には1時間以上放置、25℃の場合には2時間以上放置であった。さらにこれらは3時間以上放置したときはアグリコンの総イソフラボン重量に占める割合が20%以上になったものの、50%以上にはならなかった。

【0016】豆乳分離後のアグリコンの増加

蒸気浸漬、磨砕の試験は、大豆中に存在する $\beta$ -グルコシダーゼの作用を期待してのものであったが、豆乳分離の際の加熱処理により $\beta$ -グルコシダーゼをはじめとする酵素類は失活する。そこで種々の酵素添加によるアグリコンの遊離法に付いて検討した。

【0017】先ずはじめに、豆乳中イソフラボンのアグ

リコン遊離量から $\beta$ -グルコシダーゼ活性を持つ酵素の検索を行った。その結果、市販品ではアーモンド製の $\beta$ -D-グルコシダーゼ(オリエンタル酵母)、セルラーゼA「アマノ」(天野製薬)セルラーゼT「アマノ」(天野製薬)、セルラーゼY-NC(ヤクルト)、セルラーゼ「オノヅカ」3S(ヤクルト)、ナリンギナーゼ「アマノ」(天野製薬)ヘパチダーゼR(天野製薬)等に活性が認められた。またかびの培養物から精製した酵素についても検討した結果、アスペルギルス属とリゾプス属にこれらの活性が認められた。これらの酵素の至適温度について検討したところ、何れの酵素も40～50℃の間でもっとも活性が高くなり、アグリコンの遊離量が多く認められた。

【0018】それぞれの粗酵素類は商品によって重量あたりの $\beta$ -グルコシダーゼ活性が異なるので、ここで酵素活性の定義を行う。つまり、基質としてpH6.8の豆乳を使用し、37℃で反応させた際に、イソフラボンのアグリコンを1分間に1 $\mu$ mol 遊離させる酵素量を1 unit(U)とした。

20 【0019】これらの酵素を豆乳に $\beta$ -グルコシダーゼ換算で0.2U/ml添加し、40℃1時間反応させた後に豆腐を製造してイソフラボンのアグリコン遊離量を測定した。その結果、豆腐中イソフラボンの重量費が10%以上になった。

30 【0020】アーモンド製の $\beta$ -D-グルコシダーゼ、セルラーゼA「アマノ」、セルラーゼY-NCそしてアスペルギルス属から粗精製した酵素は、豆腐にした際のアグリコン量が20%程度までの処理であれば物性に何ら影響はなかった。これらの酵素を用いて $\beta$ -グルコシダーゼ換算で1U/mlの酵素を添加して、40℃で1時間反応させて製造した豆腐中、イソフラボンのアグリコン重量費は20%以上になった。

【0021】さらにアーモンド製の $\beta$ -D-グルコシダーゼもしくはアスペルギルス属から精製した酵素を豆乳に添加した場合には、豆腐にした際のアグリコン量が50%以上になるような処理をしたときにも、物性には問題がなかった。この場合、2U/mlの酵素を添加して、40℃で2時間以上反応することで、イソフラボンのアグリコン量が50%以上になった。

40 【0022】以上の結果を組み合わせ、豆腐の製造工程を全体としての検討を行った。先ず、豆腐の製造工程において、大豆浸漬時の水温を30℃にした。さらに大豆磨砕時の水温を15℃、30℃、50℃とし、磨砕後2時間保温した。このとき、豆腐中総イソフラボン重量に占めるアグリコン重量比は30℃および50℃で20%以上になった。

50 【0023】また、通常の浸漬を行ったものを使用し、大豆磨砕時の水温をそれぞれ15、30、50℃にし、磨砕後2時間保温した。さらにその後、豆乳に $\beta$ -グルコシダーゼ活性を持つ酵素を添加し、40℃で1時間保

温した。このとき、豆腐中総イソフラボン重量に占めるアグリコン重量比は、大豆磨砕時の水温が30℃以上で20%以上になった。

【0024】もっとも効果的な豆腐中イソフラボンのアグリコン遊離をもたらす条件を検討した。上記までの結果から、大豆浸漬時の温度はアグリコンの増加の効果には限度があるため、浸漬温度は通常のままとし、大豆磨砕時の水温を30、50℃にし、磨砕後2時間保温した。さらにその後、豆乳に精製β-グルコシダーゼを0.5 U/ml添加し、40℃で1時間保温した。このと

き、豆腐中総イソフラボン重量に占めるアグリコン重量比は、50%以上になった。

【0025】

【発明の効果】本発明の豆腐はイソフラボンのアグリコン含有量を高めたことで、イソフラボンの生体利用性を改善し、生理機能性を高めた豆腐である。本発明の豆腐を摂取することにより、抗酸化作用、抗心疾患作用、骨代謝改善作用、ガンの抑制等への効果が期待できるものである。